

• 综述 •

肿瘤新生血管与乳癌的预后

陈玉强¹ 陈正明² 综述 林大富¹ 苏文金² 审校

中国人民解放军第174医院外科(361003)¹ 厦门大学肿瘤细胞工程国家专业实验室(361005)²

肿瘤新生血管在肿瘤发展过程中具有重要的作用。临床医生常根据肿瘤大小、淋巴结状态、多倍体数量以及S期比例等来决定乳腺癌术后是否进行化疗,然而目前还没有一项指标或联合指标能可靠地预测乳腺癌术后的转归^[1]。近年发现肿瘤血管密度有可能较精确地预测肿瘤的转移趋势,是乳腺癌预后既独立而又可靠的一个指标,对乳腺癌术后的治疗有着重要的指导意义。本文就这方面作一综述。

肿瘤血管的新生

肿瘤新生血管在肿瘤发展过程中具有重要的作用。大多数癌前病变缺少新生血管,而在癌变组织中则常见大量新生血管,且新生的肿瘤血管与正常血管间存在诸多差异。新生肿瘤血管的结构缺乏连续性,血管壁仅排列一层内皮细胞,且细胞间有较多的开窗或裂隙;血管壁无平滑肌;基底膜较薄或缺如^[2]。恶性肿瘤的特征是能诱发新生血管形成。若不能诱发新生血管形成,则肿瘤的生长直径一般不超过2mm,因新生血管不但提供肿瘤生长所需要的各种营养成分,使肿瘤得以呈指数生长,而且血管向肿瘤内部生长,增加了肿瘤与血管的接触面积,并由于新生血管的结构缺陷,使肿瘤细胞能够通过血管进入血液循环造成转移^[3]。

肿瘤新生血管的形成与肿瘤细胞和基质细胞分泌的活性物质有关。乳腺癌组织中有生长因子及其受体和生长抑制因子等表达异常,这对肿瘤新生血管的形成意义重大^[4]。De jong^[5]对乳腺癌标本的冰冻切片进行免疫组化染色,分析血小板生长因子A(PDGF-A)及其受体(PDGF α R)、血小板生长因子B(PDGF-B)及其受体(PDGF β R)、转化生长因子 α (TGF α)及其受体(TGF α R)、表皮生长因子(EGF)及其受体(EGFR)、血管生长因子(VEGF)及其受体(Flt-1 Flt-1/KDR)、生长抑制因子TGF β 1和TGF β 2及其相应受体TGF β R1和TGF β R2以及基础上皮生长因子bFGF等的表达与肿瘤内微血管密度(intratatumoral microvessel density, IMD 或 iMVD 或 MVD;也有写为microvessel count, MVC)的关系,并以分裂活性指数(MAI)判定肿瘤的增殖情况,结果发现bFGF和EGFR与MAI呈正相关,而TGF β 2与MAI呈负相关。bFGF、TGF α 、TGF β 2和EGFR的表达与IMD呈正相关。TGF α 和EGFR结合有协同作用,且与MAI和IMD呈正相关。TGF β 2/TGF β R1/TGF β R2结合也反映出与IMD的正相关性。Anan和Brown^[6,7]等也有类似报道,这说明乳腺癌新生血管是血管生成刺激因子和血管生成抑制因子的不平衡调节结果。某些生长因子和受体间对新生血管有协同作用,提示生长因子及其受体等以自分泌和旁分泌形式影响肿瘤血管的形成。

乳癌血管密度的研究方法

自1991年Weidner^[8]首次报道IMD与乳腺癌预后具有相关性以来,已有相当多学者研究肿瘤血管的密度测定,但结果相差较大,不同实验的重复性差,还有相反的结论。Vermeulen^[9]指出这主要与所采用的方法、研究者的经验以及肿瘤的异质性等因素有关。肿瘤新生血管的组织学基础是内皮细胞的游走和增殖。所以研究新生血管多以免疫组织化学方法对内皮细胞进行染色,内皮细胞特异性抗体有第Ⅷ因子相关抗原抗体、CD₃₁和CD₃₄抗体。Gasparini等^[10]认为用第Ⅷ因子相关抗原抗体效果最好或最起码能得到与CD₃₁抗体一样的结果;而Harris^[11]则坚持CD₃₁是内皮细胞较为敏感的标记物;Heimann^[12]偏爱于使用CD₃₄抗体;Goulding^[13]对CD₃₁和CD₃₄两者都用。Martin^[14]对174例原发性乳腺癌标本,同时采用第Ⅷ因子相关抗原抗体、CD₃₁和CD₃₄抗体进行染色,发现CD₃₁和CD₃₄抗体可以显示比第Ⅷ因子相关抗原抗体更多的血管,它们平均最高血管数之比为100:100:81,但CD₃₁是最不可靠的抗体,其着染切片的阳性率只有87%,而CD₃₄和第Ⅷ因子相关抗原抗体的阳性率分别为98%和99%。尽管同一标本用不同抗体染色所得的结果有很大差别,但三者的最高血管密度值都与术后生存率密切相关。在我们所查阅的资料中,大部分研究作者都使用第Ⅷ因子相关抗原抗体作用为一抗,这种抗体在国内也较易购得,使用1:100的稀释度就能得到较理想的结果。除了抗体选择外,血管的计数方法对统计分析结果也有直接影响。多数是先在低倍镜($\times 100$)下寻找热点视野(hot spot),而后在高倍镜($\times 400$)下统计血管数量,以每一视野的血管数或转换成每平方毫米的血管数表示。必须以最高血管密度或3个最高血管密度的平均值来进行统计分析。若随机选20~40个视野而取其平均值,则常常得不到与乳腺癌预后相关的结果。

4 μ m切片的免疫组化染色结果能否代表整个乳癌的血管分布情况? Martin^[15]通过比较术前乳腺癌患者的血管造影图像和术后石蜡切片的IMD,发现两者具有显著相关($P < 0.003$)。说明IMD能反映乳癌的血供状态。但一般要求选择肿瘤边缘组织进行包埋,每份标本常需2~4个不同蜡块的切片,并以肿瘤边缘正常组织作为内对照。由两位以上不了解患者病情的病理学医师同时观察,以避免主观因素的干扰。

乳癌新生血管与各种临床因素及预后的相关性

Jocelyne^[16]对162例乳腺癌患者回顾性分析IMD、p53、REBB2、Bcl-2和Ki67对乳腺癌预后的参考价值,发现IMD与其

他预后因子间没有相关性。以中值43.5/mm²为标准将病人分为两组,则这两组病人的无复发生存期(relapse-free survival,RFS)和总的生存期(overall survival,OS)都有明显的差别,*P*值分别是0.002和0.037。单变量分析表明这些参数都与RFS有关,而多变量分析表明IMD是最精确的预后因素。术后进行标准化疗不能改变IMD对预后的参考值。说明IMD是一个较为独立的预后因子。Gasparini^[17]根据淋巴结转移及术后治疗情况将531例乳腺癌术后患者分为3组,研究IMD、p53基因表达、淋巴结转移情况、肿瘤大小、雌激素受体(ER)、孕激素受体(PgR)及月经状态等因素与预后的相关性,发现IMD是唯一与各组病人的RFS和OS都相关的预后因子,化疗和三苯氧胺治疗不影响IMD对乳腺癌预后的参考价值。提示对IMD高的乳腺癌患者术后应加用抗血管形成类药物。而Narita^[18]通过分析患者年龄、肿瘤大小、淋巴结状态、PgR、Bcl-2、p53、DNA多倍体、S期细胞比以及IMD等因素与乳腺癌预后的关系,发现淋巴结状态和IMD是乳腺癌独立的预后因子,但对淋巴结阳性乳腺癌患者IMD的高低只预示着复发可能性的大小,对其OS并没有预测价值。Heimann^[12]的研究证实了Narita的结果,在167例术后未经任何化学治疗和放射治疗的淋巴结阴性乳腺癌患者中,发现20年的RFS为74.8%。若以IMD15个/视野($\times 400$)作为标准将病人分为两组,低IMD组的RFS为93.1%,高IMD组的RFS为68.9% ($P=0.019$)。但也有相反的报道,Mayers^[19]以CD31为一抗对519例乳腺癌标本进行染色,平均随访时间为71个月,结果表明IMD与肿瘤大小、组织分级和激素水平无相关。在腋淋巴结阴性的人群中IMD与乳腺癌复发和死亡无相关;在腋淋巴结阳性的人群中IMD与乳腺癌复发和死亡具有相关性,但IMD不是独立的预后因子。综合不同的研究结果,笔者认为,对于乳腺癌患者IMD是一个重要的预后因素,IMD高者RFS和OS短;而IMD低者RFS和OS长;IMD对于OS的预后价值更大。淋巴结阴性、IMD低的乳腺癌患者,术后可酌情放弃化疗;IMD高的病人则需结合其他因素确定进一步治疗方案。淋巴结阳性而IMD低的乳腺癌患者标准化疗能改善其预后,而对IMD高的患者标准化疗不敏感,宜加用抗血管形成的药物。

乳癌新生血管与抗血管形成治疗

新生血管是肿瘤细胞及其周围组织的微环境发生变化造成内皮细胞迁移和增殖的结果。已经发现多种抗血管生成药物,研究较多的有TNP-470,其是烟曲霉素的衍生物,能通过抑制内皮细胞的增殖和迁移而强烈抑制肿瘤血管的新生,对原发和继发部位的毛细血管生成均有抑制作用,制成乳剂用于动脉栓塞治疗,由于能持续定向释放TNP-470,而疗效更好,与盐酸阿霉素(doxorubicin hydrochloride)联合给药,有协同作用。但TNP-470对某些免疫机能有抑制作用,如抑制NK细胞和T细胞活性^[20]。

许多肿瘤细胞能分泌血管形成素(angiogen, Ang)诱导肿瘤新生血管,对肿瘤血管的生长有着重要作用。鼠抗血管生成素单克隆抗体(26-2F)能中和Ang的作用,并显著地抑制人癌裸鼠移植瘤的形成和转移播散。但临床使用该抗体,会

与人抗球蛋白抗体起反应。目前已有嵌合体用于治疗包括恶性肿瘤在内的一系列疾病。从26-2F单克隆抗体的轻链和重链可变区克隆得cDNA,并进行测序,经PCR扩增后,亚克隆入含有人恒定区序列的表达载体。将表达载体转入鼠骨髓细胞使其分泌组合式的四聚体分子。这种嵌合体就能与Ang结合而抑制其血管形成活性。这种嵌合体与26-2F相比同样能抑制乳腺癌裸鼠移植瘤的生长,但其保留了中和Ang的活性而降低了免疫原性,从而有望用于临床治疗肿瘤等与新生血管有关的人类疾病^[21]。

还有实验表明成纤维生长因子抗体能有效抑制乳腺癌裸鼠移植瘤的血管形成;睾丸素能抑制睾丸酮诱导乳腺癌细胞T47-D表达VEGF,从而抑制血管形成^[22]。我们在实验中发现维生素A的衍生物——全反式视黄醇能有效抑制胃癌细胞裸小鼠脾移植瘤和肝转移瘤的血管形成。此外有报道干扰素、激酶抑制因子、血小板因子4和蛋白酶抑制因子等也有潜在的抑制血管形成作用^[23]。

问题与展望

已知血管形成在肿瘤生长和转移过程中具有重要的作用,但对IMD与肿瘤患者预后的关系研究时间还较短,对于肿瘤内微血管密度还没有统一的名称,研究的方法差别也较大,有的结果大相径庭。当今对乳腺癌内的IMD研究得相对较多,结果也较为一致。已显示出对乳腺癌预后的参考价值,并指导乳腺癌术后的进一步治疗,提示有一部分病人可能通过术后结合化疗和抗血管治疗而提高RFS和OS。抗血管治疗已显示出其美好的应用前景,其可能阻止肿瘤的进一步生长,抑制癌细胞的血行转移,而使肿瘤进入“休眠期”。然而抗血管治疗也可能影响到正常血管的形成,如子宫内膜的修复、创伤的愈合以及机体对心脏缺血或周围性血管的反应等^[9],因此长期使用抗血管剂还存在一定的副作用,有待进一步研究并加以克服。

参考文献

1. Narita M, Nakao K, Ogino N, et al. Independent prognostic factors in breast cancer patients. *Am J Surg*, 1998, 175: 73.
2. Caruso RA, Ciciarello, Daquino A, et al. Ultrastructural study of the vascular response in small early gastric cancer. *Histo & Histopathol*, 1996, 11: 17.
3. Woodhouse EC, Chuaqui RF, Liotta LA, et al. General mechanisms of metastasis. *Cancer(Suppl.)*, 1997, 80: 1529.
4. Yoshiji H, Gomez DE, Shibuya M, et al. Expression of factors in human cancer. *Cancer Res*, 1996, 56: 2013.
5. Dejong JS, Vandiest PJ, Vandervalk P, et al. Expression of growth factors, growth-inhibiting fac-

- tors, and their receptors in invasive breast cancer. *J Pathol*, 1998, 184: 53.
6. Anan K, Morisaki T, Katano M, et al. Vascular endothelial growth factor and platelet-derived growth factor are potential angiogenic and metastatic factors in human breast cancer. *Surgery*, 1996, 119: 333.
 7. Brown LF, Berse B, Jackman RW, et al. Expression of vascular permeability factor (vascular endothelial growth factor) and its receptors in breast cancer. *Hum Pathol*, 1995, 26: 86.
 8. Weidner N, Semple JP, Welch WR, et al. Tumor angiogenesis and metastasis-correlation in invasive breast cancer. *N Eng J Med*, 1991, 324: 1.
 9. Vermeulen PB, Gasparini G, Fox SB, et al. Quantification of angiogenesis in solid human tumors: an international consensus on the methodology and criteria of evaluation. *Eur J Cancer*, 1996, 32A: 2474.
 10. Gasparini G, Weidner N, Bevilacqua P, et al. Tumor microvessel density, p53 expression, tumor size and peritumoral lymphatic vessel invasion are relevant prognostic markers in node-negative breast carcinoma. *J Clin Oncol*, 1994, 12: 454.
 11. Fox SB, Leek RD, Smith K, et al. Tumor angiogenesis in node negative breast carcinomas-relationship with epidermal growth factor receptor, estrogen receptor and survival. *Breast Cancer Res Treat*, 1994, 29: 109.
 12. Heimann R, Ferguson D, Powers C, et al. Angiogenesis as a predictor of long-term survival for patients with node-negative breast cancer. *J Natl Cancer Inst*, 1996, 88: 1764.
 13. Goulding H, Nik Abdul Rashid NF, Robertson JF, et al. Assessment of angiogenesis in breast carcinomas: an important factor in prognosis? *Hum Pathol*, 1995, 26: 1196.
 14. Martin L, Green B, Renshaw C, et al. Examining the technique of angiogenesis assessment in invasive breast cancer. *Br J Cancer*, 1997, 76: 1046.
 15. Martin L, Holcombe C, Green B, et al. Is a histological section representative of whole tumor vascularity in breast cancer? *Br J Cancer*, 1997, 76: 40.
 16. Jacquemier JD, Penaultllorca FM, Bertucci F, et al. Angiogenesis as a prognostic marker in breast carcinoma with conventional adjuvant chemotherapy: multiparametric and immunohistochemical analysis. *J Pathol*, 1998, 184: 130.
 17. Gasparini G, Toi M, Verderio P, et al. Prognostic significance of p53, angiogenesis, and other conventional features in operable breast cancer: sub-analysis in node-positive and node-negative patients-clinical studies. *Int J Oncol*, 1998, 12: 1117.
 18. Narita M, Nakao K, Ogino N, et al. Independent prognostic factors in breast cancer patients. *Am J Surg*, 1998, 175: 73.
 19. Mayers MM, Seshadri R, Raymond W, et al. Tumor microvasculature has no independent prognostic significance for breast cancer. *Pathology*, 1998, 30: 105.
 20. Yamaoka M, Yamamoto T, Masaki T, et al. Inhibition of tumor growth and metastasis of rodent tumors by the angiogenesis inhibitor O-(chloroacetyl-carbamoyl) fumagillol (TNP-470; AGM-1470). *Cancer Res*, 1993, 53: 4262.
 21. Piccoli R, Olson KA, Vallee BL, et al. Chimeric anti-angiogenin antibody cAb 26-2F inhibits the formation of human breast cancer xenografts in athymic mice. *Proc Nat Acad Sci USA*, 1998, 95: 4579.
 22. Hyder SM, Murthy L, Stancel GM, et al. Progestin regulation of vascular endothelial growth factor in human breast cancer cells. *Cancer Res*, 1998, 58: 392.
 23. Ellis LM, Walker RA, Gasparini G. Is determination of angiogenic activity in human tumors clinically useful? *Eur J Cancer*, 1998, 34: 609.

(1999-06-17收稿)

~~~~~

(上接205页)

术、部分切除术或D1式胃癌根治术,甚至可行D2式胃癌根治术。但多数研究者认为,D2式胃癌根治术由于操作较繁复,手术时间较长,且无从清扫第11、12组淋巴结,故不适合在腹腔镜下开展。

尽管局限性微创手术是当今外科的热点,但就肿瘤的根治性,意见尚多分歧。自1963年日本建立起全国性胃癌病例登记制度至1990年,I期胃癌的5年生存率一直保持在

94.40%~99.41%水平;而本届大会汇总18家著名医疗机构90年代治疗成果却显示,Ia期和Ib期5年生存率分别为92.1%和84.5%,这是否与开展局限性微创手术有关,值得商榷。

总之,第71届日本胃癌会议为我们提供了大量的临床经验 and 最新研究动向。认真吸取他国经验和教训,将有助于提高我国的胃癌诊治水平。

(2000-01-25收稿)